

# Окрашивание фибробластов кожи взрослого человека карбоцианиновыми красителями DiI и DiO

В.В. МУЦЕНКО, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Labeling of Adult Human Skin Fibroblasts With Carbocyanine Dyes DiI and DiO

V.V. MUTSENKO, YU.A. PETRENKO

Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Для проведения мониторинга клеток в экспериментах *in vivo*, а также для определения поведения клеток при культивировании *in vitro* в составе трехмерных биоинженерных конструкций необходимы поиск и подбор эффективных маркеров и красителей. Длинноцепочечные диалкилкарбоцианины, представителями которых являются DiI и DiO, относятся к флуоресцентным красителям с высокой интенсивностью свечения, при этом вопросы об их влиянии на функциональные свойства стромальных клеток остаются недостаточно изученными.

Цель работы – определить оптимальные условия окрашивания фибробластов кожи карбоцианиновыми красителями DiI и DiO, а также оценить влияние окрашивания на жизнеспособность, адгезивные свойства, метаболическую и пролиферативную активность клеток.

В работе использовали культивированные фибробласты кожи взрослого человека. Клетки окрашивали либо при монослойном культивировании, либо после их трипсинизации и окрашивания в суспензии. Для окрашивания клеток карбоцианиновыми красителями DiI и DiO в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $2,5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М вносили порционно при постоянном перемешивании. После 30 мин экспозиции в темноте красители дважды отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1000 об/мин в течение 7 мин. После удаления красителя подсчитывали количество окрашенных клеток, а также определяли целостность их плазматической мембраны при окрашивании трипановым синим. Одновременно клетки помещали в условия культивирования для оценки их адгезии, метаболической и пролиферативной активности с использованием МТТ-теста.

Установлено, что добавление красителей DiI и DiO непосредственно при монослойном культивировании не позволило получить полноценное окрашивание клеток. Однако добавление красителей к суспензии клеток после их трипсинизации обеспечило высокую эффективность их окрашивания. При этом концентрации красителей  $5 \times 10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М были наиболее эффективными. Использование красителя DiI в различных концентрациях значительно снижало жизнеспособность клеток, что выражалось в нарушении целостности мембран клеток и снижении их адгезивных свойств и метаболической активности. Окрашивание клеток красителем DiO не отражалось на их жизнеспособности. Сохранение способности адгезии к поверхности культурального пластика, метаболическая и пролиферативная их активность не отличались от контрольных неокрашенных клеток.

For the monitoring of cells during *in vivo* experiments as well as for the determination of cells behavior during *in vitro* cell culture within three-dimensional bioengineered structures there is a strong need of choosing effective markers and dyes. Long-chain dialkylcarbocyanines DiI and DiO belong to the fluorescent dyes with high intensity of fluorescence, meanwhile the issues relating to their influence to functional properties of the stromal cells are poorly studied.

The aim of this study was to determine the optimal conditions for labeling of skin fibroblasts with carbocyanine dyes DiI and DiO, as well as to assess the influence of staining on cells viability, adhesive properties, metabolic and proliferative activity.

The *in vitro* cultured human adult skin fibroblasts were used in this study. Cell staining was performed either in monolayer culture or after cell detachment and staining in suspension. Carbocyanine dyes DiI and DiO in concentrations of  $10^{-6}$ ,  $2,5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M were stepwise added during permanent shaking. After 30 min incubation in darkness, dyes were washed out twice by Hank's buffer using centrifugation at 1,000 rpm during 7 min. After the removal of the dyes, cells were counted to assess the number of stained cells as well to determine the integrity of plasma membrane, using trypan blue staining. In parallel, cells were plated for the determination of their adhesion, metabolic and proliferative activity, assessed by MTT assay.

Staining of cells with DiI and DiO directly during monolayer culture did not allow obtaining the optimal number of cells stained. However the addition of dyes to cell suspension after their detachment resulted in high staining efficiency. In this case, the most effective concentrations appeared to be  $5 \times 10^{-6}$  и  $10^{-5}$  M. At the same time, the application of DiI dye in different concentrations resulted in significant decrease in cells viability, including disruption of plasma membrane, decrease in adhesive and metabolic properties. Alternatively staining of cells by DiO had no effect on viability of cells. Cells could be able to adhere onto culture plastic, their metabolic and proliferative activity did not differ from non-stained control cells.